



TITLE:

酵母CbHap複合体によるメタノール誘導性遺伝子の発現制御機構(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

小田, 沙織

CITATION:

小田, 沙織. 酵母CbHap複合体によるメタノール誘導性遺伝子の発現制御機構. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19777>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-07-01に公開; 許諾条件により要約は2017-03-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	小田沙織
論文題目	酵母CbHap複合体によるメタノール誘導性遺伝子の発現制御機構		
(論文内容の要旨)			
<p>天然ガスやバイオマスから合成可能なメタノールは、石油・石炭に替わる炭素資源として期待されている。メタノールを原料とした微生物生産には、メタノールの効率的な代謝や遺伝子発現制御系の理解が重要である。メタノールを単一の炭素・エネルギー源として生育できるメチロトロフ酵母は、メタノールによって誘導される強力な遺伝子プロモーターを持つことから、異種タンパク質の高生産宿主として、実験室レベルから産業レベルまで広く利用されている。しかし、その強力なメタノール誘導性遺伝子発現を制御する分子メカニズムについては不明の点が多い。</p> <p>本論文では、メチロトロフ酵母<i>Candida boidinii</i>において、転写因子CbHap複合体がメタノール誘導性遺伝子発現の制御に関わることを新たに見いだした。Hap複合体は真核生物に広く保存された転写因子であり、<i>Saccharomyces cerevisiae</i>においては呼吸代謝関連遺伝子を制御することが知られている。しかし、<i>C. boidinii</i>においては、呼吸関連代謝の遺伝子制御ではなく主にメタノール誘導に関与していることを示した。さらに、CbHap複合体構成因子の1つであるCbHap3について、核輸送やDNA結合、転写活性化に必要な領域を特定した。その主な内容は以下の通りである。</p>			
<p>1. <i>C. boidinii</i>において、Hap複合体構成因子であるCbHap2、CbHap3、CbHap5を同定した。これらの遺伝子破壊株はメタノール培地で生育不能であったが、その他の炭素源では野生株と同程度の生育を示した。またこれらの破壊株では複数のメタノール誘導性遺伝子プロモーターの転写活性が顕著に低下していた。蛍光顕微鏡での観察により、CbHap2、CbHap3、CbHap5は炭素源の種類によらず常に核に局在することがわかった。さらにクロマチン免疫沈降実験(ChIP)により、これらの因子がメタノール誘導性遺伝子プロモーターに特異的に結合することがわかった。以上の結果より、CbHap2、CbHap3、CbHap5がメタノール誘導性遺伝子の転写を正に制御することを示した。</p>			

2. ChIPにより、CbHap2、CbHap3、CbHap5が、互いに、直接相互作用して、複合体を形成することを示した。CbHap2 および CbHap5 には nuclear localization signal (NLS) 推定領域が存在し、この2つの因子は単独でも核に局在していた。一方、CbHap3は、NLSを持たず、CbHap5が欠損した場合には細胞質に局在したことから、CbHap3はCbHap5依存的に核へ輸送されることがわかった。さらに CbHap2 および CbHap5 が欠損した場合、CbHap3の遺伝子プロモーターへの結合が消失したことから、CbHap2、CbHap3、CbHap5が複合体を形成してDNAに結合することを示した。

3. CbHap3 (全長 292アミノ酸残基)とScHap3(*S. cerevisiae*のCbHap3ホモログ、全長 144アミノ酸残基)のアミノ酸配列を比較すると、N末端領域は高い相同性を示した。一方、CbHap3のC末端側には、ScHap3には見られないが、他のメチロトロフ酵母において高度に保存されている延長領域が見いだされた。CbHap3は*S. cerevisiae*遺伝子破壊株*Schap3Δ*の生育能を相補できたが、ScHap3は*C. boidinii*遺伝子破壊株*Cbhap3Δ*の生育能を相補しなかった。一方、ScHap3にCbHap3のC末端領域を融合したキメラHap3は、*Cbhap3Δ*の生育能を相補したことから、CbHap3のC末端側領域がメタノール誘導性遺伝子発現に重要であることがわかった。さらに CbHap3のアミノ酸を段階的に欠失させた結果、N末端領域(16-100アミノ酸残基)は核局在とDNA結合に必要であり、C末端側(225-292アミノ酸残基)はDNAに結合した後の遺伝子転写活性化に必要であることを明らかにした。

以上の結果より、CbHap2、CbHap3、CbHap5はまず細胞質で複合体を形成し、CbHap2およびCbHap5のNLSによって核へ輸送されてメタノール誘導性遺伝子プロモーターに結合し、CbHap3のC末端側領域依存的にメタノール誘導性遺伝子の転写を活性化することを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、メチロトロフ酵母におけるHap複合体の役割を初めて明らかにしたものである。Hap複合体は、出芽酵母では呼吸代謝関連遺伝子の発現を制御することが知られていたが、メチロトロフ酵母 *C. boidinii*においては、メタノール誘導性遺伝子発現の制御に特異的に機能していることを初めて明らかにした。評価すべき点は以下の点である。

1. メタノール誘導性遺伝子発現に関わる因子としてCbHap2、CbHap3、CbHap5を同定した。
2. CbHap2、CbHap3、CbHap5はメタノール誘導性遺伝子発現を正に制御する転写因子であるが、常にDNAに結合しているにも関わらず、メタノール以外の炭素源での生育には必須ではないことを示した。
3. CbHap複合体は、CbHap2およびCbHap5に存在するNLSによって核へ輸送されることを明らかにした。
4. CbHap2、CbHap3、CbHap5が複合体を形成して、DNAに結合することを示した。
5. 様々な生物種間で保存されているCbHap3のN末端領域は、核局在やDNA結合といった染色体DNAへの結合に必要な基本的機能を持つことを示した。
6. メチロトロフ酵母間で高度に保存されているCbHap3のC末端領域は、核局在やDNA結合には関与せず、メタノール誘導性遺伝子の転写活性化に必要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、異種タンパク質生産に有用なメチロトロフ酵母において、Hap複合体が、メタノール誘導性遺伝子発現に特異的な機能を持つことや、その遺伝子活性化のメカニズムを分子レベルで初めて明らかにしたものである。これらの成果は、メタノール誘導性遺伝子発現の分子機構解明に重要な知見を提供するもので、制御発酵学、分子細胞生物学、応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月4日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）